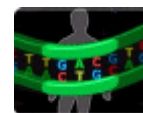




SIF - FARMACOGENETICA



Newsletter Numero 71 – Marzo 2015

Attenzione: le informazioni riportate hanno solo un fine illustrativo
e non sono riferibili né a prescrizioni né a consigli medici

Sommario

⇒ Oncologia

- Il polimorfismo c.*237C>T del fattore di crescita vascolare endoteliale di tipo A (VEGF-A) è associato all'efficacia del bevacizumab e all'insorgenza di ipertensione nel tumore metastatico del colon-retto (mCRC)
- Il micro-RNA let-7a modifica l'effetto del gene HIWI sulla sopravvivenza di pazienti affetti da carcinoma ovarico epiteliale
- LGR5 rs17109924 come biomarcatore predittivo di ricaduta in pazienti con carcinoma del colon trattato con chemioterapia a base di 5-fluorouracile
- Citocromo P450 2J2, un nuovo enzima chiave nella bioattivazione della ciclofosfamide e un potenziale biomarcatore per neoplasie ematologiche

⇒ Immunomodulazione

- Associazione del polimorfismo CD58 con la sclerosi multipla e la risposta alla terapia con interferon β in un gruppo di pazienti iraniani
- Variazioni genetiche nel gene apoptotico BCL2L1 aumentano la risposta al trattamento basato sull'interferone in pazienti con infezione da virus dell'epatite c di genotipo 3
- Polimorfismi dei gene del recettore dei glucocorticoidi e del glucocorticoid-induced transcript 1 sono associati alla gravità della patologia e alla risposta della terapia ponte con glucocorticoidi nell'artrite reumatoide

⇒ Dismetabolismi

- Uno studio di associazione genome-wide indentifica ABCG2 (BCRP) come trasportatore dell'allopurinolo e fattore genetico predittivo della risposta al farmaco

⇒ Neurologia

- Analisi di network di espressione genica condotta su sangue periferico suggerisce il coinvolgimento di mTOR e NF- κ B nell'insorgenza di sintomi extrapiramidali indotti da antipsicotici

⇒ Cardiovascolare

- La farmacogenetica del warfarin nella popolazione cinese

⇒ La metanalisi del mese

- Studio di meta-analisi sul ruolo predittivo delle mutazioni di BRAF in pazienti con cancro del colon retto avanzato in terapia con cetuximab e panitumumab

ONCOLOGIA**IL POLIMORFISMO C.*237C>T DEL FATTORE DI CRESCITA VASCOLARE ENDOTELIALE DI TIPO A (VEGF-A) È ASSOCIATO ALL'EFFICACIA DEL BEVACIZUMAB E ALL'INSORGENZA DI IPERTENSIONE NEL TUMORE METASTATICO DEL COLON-RETTO (MCRC)**

A cura delle Dott.sse Valentina Citi e Marzia Del Re

Il tumore metastatico del colon-retto (mCRC) è la terza patologia più diffusa in Occidente e circa nella metà dei casi ha una prognosi infausta. Il regime chemioterapico approvato prevede la combinazione di 5-fluorouracile con oxaliplatino e/o irinotecano, aumentando la sopravvivenza oltre i 20-23 mesi. Dal 2004 questo schema terapeutico è stato combinato con la *target therapy*, portando un ulteriore miglioramento in termini di sopravvivenza grazie all'utilizzo del bevacizumab, anticorpo monoclonale selettivo per il fattore di crescita vascolare endoteliale di tipo A (VEGF-A), la cui efficacia è stata dimostrata sia in prima che in seconda linea. A differenza delle mutazioni di RAS che predicono resistenza al trattamento con inibitori di tirosin-chinasi, non esistono ancora fattori predittivi per l'efficacia del bevacizumab. Alcuni autori hanno focalizzato l'attenzione sui livelli intratumorali di VEGF-A, sulla presenza di cellule endoteliali circolanti e su alcune mutazioni localizzate sui geni riguardanti il pathway del VEGF. Tra queste, è importante menzionare l'allele C (c.-958C>T) del gene VEGF-A che provoca un incremento dei livelli di VEGF-A promuovendo la progressione tumorale e l'invasione metastatica; l'allele C (c.-2055A>C e c.*237C>T), l'allele G (c.-94C>G) e l'allele G (c.-614A>G) inducono una minore vascolarizzazione e agiscono sui livelli circolatori di VEGF-A. Inoltre è stato riportato anche il ruolo predittivo in termini di PFS di altre mutazioni presenti sul gene VEGF-A (c.-2595A>C, c.-1154A>G, c.-634C>G, c.*237C>T e c.-1498C>T) in pazienti affetti da tumore metastatico della mammella trattati con chemioterapia e bevacizumab. Poiché i dati riguardanti il tumore metastatico del colon rimangono controversi, gli autori di questo studio hanno valutato la correlazione tra le mutazioni di VEGF-A (c.-2595A>C), di VEGFR-1 (c.3635+319G>T), di VEGFR-2 (c.-906T>C, c.889G>A e c.1416A>T) e di HIF-1 (c.1744C>T), con il TTF (*time to treatment failure*), PFS (*progression-free survival*), OS (*overall survival*) e l'insorgenza dell'ipertensione in pazienti affetti da mCRC trattati con bevacizumab.

Da settembre 2005 a gennaio 2014, 116 pazienti hanno ricevuto bevacizumab. Di questi, i campioni di DNA sono stati ottenuti da 95 pazienti e i dati clinici da 89 (età media è 63.6% anni, 70.8% maschi). Nella maggior parte dei casi (75.3%), il sito primario del tumore è il colon retto. Inoltre il bevacizumab è stato principalmente somministrato in prima linea in associazione con FOLFIRI (77.5%), con FOLFOX (6.8%), LV5FU2 (10.1%), altro (5.6%). Il TTF medio era di 12.4 mesi (95% CI [9.5–15.2]) ed è emersa correlazione con la mutazione di VEGF-A rs3025039 (c.*237C>T). Infatti, pazienti omozigoti *wild type* CC mostrano un maggiore TTF (media 14.2 mesi, 95% CI[11.4–17]) a differenza dei pazienti eterozigoti CT (TTF = 6.3 mesi (95% CI [5.2–7.4]) ed omozigoti mutati TT (TTF = 4.4 mesi, 95% CI [0.6–8.2]). Dato il numero limitato di pazienti omozigoti mutati (3 casi TT), questo gruppo è stato unito agli eterozigoti (4 casi CT): anche in questo caso il valore di TTF rimane significativamente minore per i pazienti omozigoti mutati CC (6.0 *versus* 14.2 mesi; $p = 0.022$). Per quanto riguarda la PFS, essa è associata al polimorfismo VEGF-A c.*237C>T: pazienti *wild type* CC mostrano una PFS di 15.0 mesi (95% CI [12.4–17.6]), a differenza degli eterozigoti CT e omozigoti mutati TT in cui la PFS è di 7 mesi (95% CI [5.1–8.8]). Il polimorfismo sopra menzionato correla in maniera significativa anche con i valori medi di OS: pazienti con il genotipo *wild type* CC mostrano una OS di 29.1 mesi (95% CI [23.9–34.2]) a differenza dei pazienti eterozigoti CT e omozigoti mutati TT in cui il valore di OS è di 19.7 mesi (95% CI [13.9–25.4]).

Il fenomeno principale della tossicità da bevacizumab è l'insorgenza di ipertensione riportata nel 24.7% dei pazienti, di cui il 2.2% di grado 1, il 12.4% di grado 2 e il 10.1% di grado 3. Ulteriori tipi di tossicità riscontrate sono state epistassi per il 22.5% dei pazienti, proteinuria di grado 1-2 nel 14.6% dei casi, 2 casi di perforazione gastrointestinale (grado 2 e 3) e tre casi di trombosi (due eventi di embolia polmonare e uno di trombosi dell'arteria iliaca interna). L'ipertensione iatrogena è stata associata al polimorfismo VEGF-A

c.*237C>T: pazienti *wild type* CC mostrano ipertensione di grado maggiore a uno rispetto ai pazienti eterozigoti CT e omozigoti mutati TT (29.5% vs 7.1%, $p = 0.019$).

Questo studio mostra che il polimorfismo VEGF-A c.*237C>T è significativamente associato alla PFS, alla OS e alla TTF, parametri che vengono aumentati in presenza del genotipo CC (*wild type*). Inoltre, per quanto riguarda la tossicità da bevacizumab, il genotipo *wild type* è associato all'insorgenza di ipertensione di grado maggiore rispetto ai genotipi CT e TT.

Bevacizumab è ad oggi uno dei principali trattamenti per il mCRC e nell'era della medicina personalizzata, determinare fattori che predicano la risposta al trattamento è essenziale per identificare sottogruppi di pazienti che possano beneficiare della terapia senza avere eccessiva tossicità. I risultati di questo studio mostrano una potenziale rilevanza clinica del polimorfismo VEGF-A c.*237C>T sebbene siano necessari studi più ampi per confermare e validare questi risultati preliminari.

Parole chiave: mCRC, VEGF-A, bevacizumab, c.*237C>T.

Riferimento bibliografico

[Sibertin-Blanc C](#) et al. *Dig Liver Dis* 2014 Dec 30 [Epub ahead of print].

IL MICRO-RNA LET-7A MODIFICA L'EFFETTO DEL GENE HIWI SULLA SOPRAVVIVENZA DI PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA OVARICO EPITELIALE

A cura della Dott.ssa Gloria Ravegnini

Il gene HIWI fa parte della superfamiglia genica PIWI, *P-element induced wimpy testis*, codificanti per proteine regolatorie che ricoprono importanti ruoli nell'auto-rinnovamento delle cellule staminali, nel silenziamento e nella regolazione translazionale dell'RNA. HIWI è una proteina ribonucleica di 861 aminoacidi con attività endonucleasica in grado di tagliare specifici RNAs che legano in modo complementare piccoli RNA non codificanti (sncRNA); questo fa sì che HIWI sia in grado di regolare l'espressione genica di particolari geni, attraverso l'interazione con sncRNA. Recentemente è stato riportato che HIWI può interagire con diversi microRNAs, tra i quali let-7a, nella regolazione dell'espressione genica (Chen R et al. *PLoS One* 2012,7:e51724). L'espressione aberrante di HIWI è stata associata con tumorigenesi e sopravvivenza. A supporto di questo, Lim et al (*PLoS One* 2014,9:e99687) hanno riportato che l'espressione di tale proteina era molto elevata nel carcinoma ovarico epiteliale (EOC) rispetto a quella in tessuto normale o nel tumore benigno, suggerendo che l'espressione di HIWI poteva essere associata a sviluppo e progressione del cancro ovarico. Date le suddette premesse, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare il significato prognostico di HIWI e del miR let-7a nel cancro ovarico epiteliale.

Nell'analisi sono state arruolate 221 pazienti affette da carcinoma ovarico epiteliale; per ogni soggetto sono state determinate lo stadio della malattia e il grado tumorale. La maggior parte delle pazienti aveva ricevuto un intervento chirurgico citoreducente seguito da chemioterapia con un periodo di follow-up medio di 31 mesi (range 0.6-114 mesi). Le pazienti sono state suddivise in quattro gruppi in base al tipo di risposta alla chemioterapia: i) risposta completa, CR; ii) risposta parziale, PR; iii) malattia stabile, SD; iv) malattia in progressione, PD. In particolare, delle 176 pazienti con dati chemioterapici disponibili, 128 avevano mostrato una risposta completa, mentre 48 ($n=36$: PR, $n=4$: SD; $n=8$: PR) ricadevano in uno degli altri 3 gruppi (raggruppati come *no response*). Allo scopo di valutare i livelli di espressione di HIWI e del miR let-7a, è stato estratto RNA e retrotrascritto a cDNA; i livelli di espressione sono stati quindi normalizzati con RNU48. L'espressione è stata quantificata come indice di espressione, EI, calcolata come $1000 \times 2^{-\Delta Ct}$, dove $\Delta Ct = Ct \text{ target} - Ct \text{ RNU48}$. Per analizzare l'associazione di HIWI con sopravvivenza e caratteristiche patologiche, i valori EI sono stati suddivisi in bassi, medi ed elevati, mentre i valori di let-7a sono stati raggruppati in bassi ed elevati, impiegando la mediana come valore di cut-off.

Delle 221 pazienti analizzate, 82 (38.9%) mostravano livelli di HIWI non rilevabili mentre 129 avevano livelli di espressione apprezzabili con EI medio di 0.32 (range 0.02-4.86). Allo scopo di investigare l'impatto

dell'espressione di HIWI sulla prognosi della malattia, gli individui sono stati suddivisi in 3 gruppi: espressione bassa, $EI=0$, $n=82$; espressione media $0 < EI < 0.32$, $n=65$; espressione elevata $EI \geq 0.32$, $n=64$ (EI cut-off= 0.32). Le curve di Kaplan-Meier hanno evidenziato che le pazienti con bassa ed elevata espressione di HIWI avevano una prognosi più favorevole rispetto a quelle con espressione media; sulla base di questa osservazione i gruppi con espressione bassa ed elevata sono stati dunque combinati. Da ciò è stato osservato che pazienti con espressione media avevano una sopravvivenza globale (*overall survival OS*) peggiore rispetto a quelle con espressione bassa o elevata ($P=0.025$); le analisi uni e multivariata hanno ulteriormente confermato il dato, evidenziando che un'espressione media di HIWI era associata con un aumentato rischio di morte, anche dopo un aggiustamento per età all'operazione, stadio della malattia, grado tumorale, tipo istologico e stato della chemioterapia ($HR= 1.63$ 95% CI: 1.06–2.52; $HR=1.89$, 95% CI:1.29-2.98, in analisi uni e multivariata rispettivamente)

Per quanto riguarda l'associazione dell'espressione di HIWI con la risposta alla chemioterapia è stato osservato che le pazienti con un'espressione media avevano una risposta peggiore rispetto a quelle del gruppo a bassa o elevata espressione ($OR=3.01$, 95% CI: 1.50– 6.04). Prendendo in considerazione il microRNA, l'espressione media di let-7a è stata di 4.62 EI (range=0.53-35.3). Per esaminare una possibile relazione tra i livelli di espressione di HIWI e let-7a le pazienti sono state prima di tutto raggruppate in base al livello del miRNA, in alto ($EI \geq 4.62$) e basso ($EI < 4.62$) e successivamente suddivise in 4 gruppi: gruppo 1 con let-7a basso e HIWI basso ($EI=0$) o alto ($EI \geq 0.32$); gruppo 2 con let-7a alto e HIWI basso o alto; gruppo 3 con let-7a basso e HIWI medio ($0 < EI < 0.32$); gruppo 4 con let-7a alto e HIWI medio. Mediante modello multivariato di Cox è stato osservato che il rischio di morte aumentava progressivamente passando dal gruppo 1 al 4 (Gruppo 2 - $HR=1.11$, 95% CI: 0.66–1.86. Gruppo 3 - $HR=1.64$, 95% CI: 0.88–3.04. Gruppo 4 - $HR=2.71$, 95% CI: 1.38–5.32).

Infine per analizzate più approfonditamente l'interazione HIWI/Let-7a, la popolazione è stata stratificata in base all'espressione di Let-7a (alta vs bassa). Da ciò si è evinto che tra i pazienti con elevata espressione di let-7a, la presenza di un'espressione media di HIWI aumentava significativamente il rischio di morte rispetto agli altri ($HR=2.62$, 95% CI: 1.30–5.30).

Questa sinergia potrebbe suggerire che HIWI non solo si lega fisicamente a let-7a ma anche che tale interazione potenzia l'effetto biologico della proteina stessa; l'accrescimento dell'effetto biologico potrebbe inoltre avvenire tramite step multipli, mediante l'attivazione, ad opera di let-7a, di proteine come IGF-II, CXCL6, PDRX1 e NF- κ B note per essere positivamente associate con il rischio e lo sviluppo di EOC.

In conclusione, lo studio ha evidenziato che l'espressione del gene HIWI è associata con OS e con risposta alla chemioterapia nel carcinoma epiteliale ovarico.

Inoltre è stata osservata un'interazione sinergica tra il miRNA let-7a e HIWI sulla sopravvivenza globale; questa scoperta suggerisce che sia HIWI che let-7a potrebbero avere implicazioni cliniche nella prognosi di tale carcinoma e che la loro modulazione potrebbe rappresentare una nuova potenziale strategia nel trattamento del carcinoma ovarico epiteliale.

Parole chiave: carcinoma ovarico epiteliale, chemioterapia post-intervento citoriduttivo, let-7a

Riferimento bibliografico

[Lingeng Lu](#) et al. *Mol Carcinog* 2015 Jan 28.

LGR5 RS17109924 COME BIOMARCATORE PREDITTIVO DI RICADUTA IN PAZIENTI CON CARCINOMA DEL COLON TRATTATO CON CHEMIOTERAPIA A BASE DI 5-FLUOROURACILE

A cura della Dott.ssa Lucia Gozzo

Il carcinoma del colon rappresenta la seconda causa di morte in Europa, con una sopravvivenza a cinque anni $< 10\%$ in caso di malattia metastatica. La ricomparsa del tumore dopo chirurgia curativa rimane un problema di importanza fondamentale, da risolvere per migliorare la sopravvivenza globale. Il rischio di ricaduta può

essere significativamente ridotto trattando i pazienti in stadio III e in stadio II ad alto rischio con chemioterapia a base di 5-fluorouracile. Considerato che la maggior parte dei pazienti riceve un trattamento adiuvante senza beneficio, è elevato il bisogno di biomarcatori per guidare le strategie terapeutiche. La presenza di polimorfismi nella linea germinale può contribuire a determinare l'*outcome* e la chemio-resistenza. In uno studio recente sono stati valutati 25 polimorfismi precedentemente associati con ricaduta in 234 pazienti con tumore al colon in stadio III e in stadio II ad alto rischio trattati con chemioterapia a base di 5-fluorouracile, trovando un'associazione significativa tra gli alleli minori di geni associati alle cellule staminali tumorali, CD44 rs8193 C>T, ALCAM rs1157 G>A e LGR5 rs17109924 T>C e l'aumento del *time to recurrence* (TTR) (Gerger A et al. *Clin Cancer Res* 2011, 17:6934–43). Tuttavia in questo studio non è stato possibile correlare i genotipi con l'*outcome* clinico in un gruppo di controllo non trattato poiché tutti i pazienti sono stati sottoposti a terapia adiuvante.

Lo scopo di questo studio era quello di confermare i dati preliminari dei polimorfismi CD44 rs8193 C>T, ALCAM rs1157 G>A e LGR5 rs17109924 T>C in una coorte più ampia e indipendente di pazienti con tumore al colon in stadio III e in stadio II ad alto rischio trattati con chemioterapia adiuvante a base di 5-fluorouracile o solo chirurgia.

Tra il 1995 ed il 2011, sono stati reclutati 742 pazienti con carcinoma del colon in stadio II e III. Per 599 erano disponibili campioni paraffinati con tessuto normale adiacente al tessuto tumorale per effettuare i test genetici germinali. Di questi, 391 pazienti erano stati trattati con chemioterapia a base di 5-fluorouracile, e 208 erano stati sottoposti solo ad intervento chirurgico. Ogni paziente è stato monitorato con visite e valutazione dei livelli del marcatore tumorale *carcinoembryonic antigen* (CEA) ogni 3 mesi per 3 anni, ogni 6 mesi al quarto e quinto anno, e annualmente dal sesto al decimo anno dalla chirurgia, con una colonscopia ad un anno e poi ogni 3-5 anni, una radiografia del torace ed una ecografia addominale o una TC torace-addome ogni 3-6 mesi per i primi 5 anni ed una radiografia del torace ed una ecografia addominale tra i 6 e i 10 anni. *End-point* primario dello studio era rappresentato dalla valutazione del TTR, definito come il tempo dalla data dell'intervento al momento della ricomparsa del tumore. *End-point* secondario era l'*overall survival* (OS) definita come tempo tra la data dell'intervento e la morte per qualsiasi causa.

L'età media al momento della diagnosi dei 391 pazienti trattati con chemioterapia adiuvante era 62 anni. Una ricaduta di malattia è stata osservata in 127 pazienti (35%), con una probabilità di ricaduta a tre anni del 35,8% nei pazienti in stadio III e del 15,7% nei pazienti in stadio II. I geni CD44 rs8193 e ALCAM rs1157 non hanno mostrato un'associazione con il TTR. I pazienti sottoposti a chirurgia e chemioterapia adiuvante portatori di almeno un allele C nel gene LGR5 rs17109924 presentavano un incremento significativo del TTR in confronto ai pazienti omozigoti T/T ($p=0,006$), con una ricorrenza a tre anni del 15,8% nei portatori della variante C e del 34% negli omozigoti T/T. Nei pazienti sottoposti solo a chirurgia, non è stata invece trovata questa associazione ($p=0,728$), ed i portatori di almeno un allele minore presentavano una probabilità a tre anni di ricaduta del 29,4% in confronto al 25,9% degli omozigoti T/T. Anche dopo aggiustamento per età, sesso, stadio clinico, numero di linfonodi asportati, invasione linfatica, vascolare e peri-neurale, la presenza dell'allele LGR5 rs17109924 è rimasto associato in maniera significativa con il TTR ($p=0,008$) nei pazienti trattati con chirurgia e chemioterapia adiuvante. Nessuna associazione significativa è stata trovata tra i polimorfismi e l'OS. Dei 391 pazienti trattati con chemioterapia, 271 (69,6%) hanno ricevuto 5-fluorouracile o capecitabina come monoterapia, e 103 (26,3%) hanno ricevuto il regime di associazione di questi farmaci con l'oxaliplatino (rispettivamente FOLFOX o XELOX). Il 4,1% (16 pazienti) ha invece ricevuto vari tipi di chemioterapia adiuvante in *trial* clinici e sono stati esclusi dall'analisi. L'allele LGR5 rs17109924 è risultato statisticamente significativo per il TTR nei pazienti trattati con 5-fluorouracile o capecitabina in monoterapia. Nessuna associazione è stata invece trovata nei pazienti trattati con FOLFOX o XELOX.

In questo studio sono stati valutati gli alleli CD44 rs8193 C>T, ALCAM rs1157 G>A e LGR5 rs17109924 T>C su una coorte di 742 pazienti con carcinoma del colon in stadio II e III, confermando che LGR5 rs17109924 rappresenta un *marker* predittivo per il TTR di pazienti trattati con chemioterapia adiuvante. L'LGR5 era stato originariamente isolato come recettore a sette domini trans-membrana accoppiato a proteine G (GPCR), ricco di leucina, avendo come target la via di segnalazione Wnt. Barker et al (Barker N et al. *Nature* 2007; 449: 1003–1007) hanno riportato l'espressione dell'LGR5 nelle cellule colonnari delle cripte dell'intestino tenue ed hanno dimostrato che una singola cellula colonnare alla base delle cripte LGR5-

positiva è capace di rigenerare tutte le linee epiteliali in un periodo di 60 giorni. Inoltre gli stessi autori hanno dimostrato in un modello animale che le cellule staminali LGR5-positivo rappresentano le cellule di origine dei tumori intestinali (Barker N et al. *Nature* 2009; 457:608–611). Questi dati suggeriscono che l'LGR5 possiede un ruolo importante nella tumorigenesi del carcinoma del colon. In studi precedenti l'LGR5 è risultato over-espresso nel carcinoma epatocellulare, nel carcinoma ovarico, nel carcinoma a cellule basali e nell'adenocarcinoma esofageo (Yamamoto Y et al. *Hepatology* 2003, 37:528–33; McClanahan T et al. *Cancer Biol Ther* 2006, 5:419–26; Tanese K et al. *Am J Pathol* 2008, 173:835–43; Becker L et al. *Dis Esophagus* 2010, 23:168–74). Wu et al. hanno trovato che livelli elevati di espressione del recettore LGR5 sono solitamente associati con tumori metastatici, avanzati e più aggressivi e con una prognosi peggiore (Wu XS et al. *World J Surg Oncol* 2012, 10: 244). Il precedente studio di Gerger et al. (*Clin Cancer Res* 2011, 17:6934–43) ha mostrato come l'allele minore LGR5 rs17109924 T>C possa predire indipendentemente l'aumento di TTR nei pazienti con carcinoma del colon trattati con chemioterapia a base di 5-fluorouracile. È stato ipotizzato che il genotipo *wild-type* sia associato ad una espressione più elevata di LGR5 con conseguente ridotto TTR. Kleist et al. (*Am J Transl Res* 2012, 4:279–90) hanno trovato una espressione immunohistochimica significativamente più bassa nei portatori delle varianti alleliche, in confronto ai *wild-type*, con un più lungo TTR.

In conclusione, i risultati di questo studio confermano, in una coorte ampia e indipendente retrospettiva, che l'allele LGR5 rs17109924 rappresenta un *marker* per il TTR di pazienti con carcinoma del colon trattati con chemioterapia adiuvante a base di 5-fluorouracile.

Parole chiave: carcinoma del colon, 5-fluorouracile, LGR5

Riferimento bibliografico

[Szkandera J](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2015 Feb 10 [Epub ahead of print].

CITOCROMO P450 2J2, UN NUOVO ENZIMA CHIAVE NELLA BIOATTIVAZIONE DELLA CICLOFOSFAMIDE E UN POTENZIALE BIOMARCATORE PER NEOPLASIE EMATOLOGICHE

A cura della Dott.ssa Stefania Cheli

Il citocromo P450 2J2 (CYP2J2), presente in particolare nei sistemi intestinale e cardiovascolare, è stato recentemente associato al metabolismo di alcuni xenobiotici e farmaci. L'elevata attività di CYP2J2 a livello intestinale potrebbe spiegare il metabolismo di primo passaggio di diversi farmaci. Nell'uomo a livello cardiaco, CYP2J2 è responsabile dell'eossidazione dell'acido arachidonico endogeno in quattro acidi epossieicosatrienoici che vengono rilasciati in risposta all'ischemia. CYP2J2 è altamente espresso sia nell'uomo che nel topo, nelle linee cellulari ematologiche (K562, HL-60, Raji, MOLT-4, SP2/0, Jurkat ed EL4), così come nel sangue periferico e nelle cellule del midollo osseo di pazienti leucemici. L'espressione del citocromo CYP2J2 nelle cellule HL-60 potrebbe spiegare gli effetti citotossici della ciclofosfamide (Cy) osservati nonostante la mancata espressione del citocromo CYP2B6 in questa linea cellulare. La Cy è un profarmaco che, soprattutto a livello epatico, viene metabolizzato nel principale metabolita attivo (90% del Cy totale) 4-idrossi-ciclofosfamide (4-OH-Cy). Il metabolismo avviene ad opera del CYP2B6 e in misura minore risultano coinvolti anche gli enzimi CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 e CYP2C19. Successivamente, il metabolita 4-OH-Cy è degradato a mostarda fosforamidica e acroleina (responsabile della tossicità urinaria). La fosforamide alchila le basi azotate guaniniche del DNA in posizione N7 dell'anello imidazolico, innescando quindi l'apoptosi dovuta alla formazione di legami crociati adenina-guanina tra i due filamenti del DNA (interstrand). È stata riportata un'elevata variabilità inter ed intra individuale nella cinetica della Cy che influenza sia l'efficacia che la tossicità della terapia. Tale variabilità è stata attribuita principalmente a polimorfismi presenti nel gene CYP2B6, come CYP2B6*4, CYP2B6*6 e CYP2B6*9. Tuttavia, recenti studi hanno concluso che i polimorfismi dei CYPs non hanno un ruolo significativo nella variabilità di risposta alla Cy.

Il presente studio è volto ad indagare l'espressione del CYP2J2 e di altri CYPs in pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali trattati con Cy confrontati con volontari sani. Inoltre, in questo lavoro viene

analizzato il ruolo *in vitro* del CYP2J2 nella bioattivazione della Cy, utilizzando cellule della linea leucemica e microsomi esprimenti DNA complementare CYP2J2. Questi risultati sono stati correlati alla cinetica della Cy e del suo metabolita attivo.

In questo studio sono stati inclusi 20 pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali al *Center for Allogenic Stem Cell Transplantation*, Karolinska University Hospital-Huddinge, Sweden. Lo studio è stato approvato dal comitato etico del Karolinska Institute. Come gruppo di controllo sono stati arruolati 12 volontari sani, di età media tra i 18 ed i 55 anni (6 maschi e 6 femmine). I campioni di sangue periferico sono stati prelevati da entrambi i gruppi al fine di ottenere le cellule mononucleate. Undici pazienti sono stati sottoposti a 2 giorni di trattamento con Cy (60mg kg^{-1} al giorno) somministrata per infusione endovenosa di 1 ora, seguita da radioterapia totale. Nove pazienti sono stati sottoposti a 5 giorni di trattamento con fludarabina (Flu) (30mg kg^{-1} al giorno) somministrata per infusione endovenosa, seguiti da 2 giorni d'infusione endovenosa di 1 ora di Cy (60mg kg^{-1} al giorno) e/o radioterapia totale. I campioni di sangue per l'estrazione dell'RNA sono stati raccolti prima della somministrazione di Flu e Cy e a 6, 24 e 30 ore dall'ultima infusione di Cy. Per la determinazione della cinetica della Cy e del metabolita 4-OH-Cy, i campioni di sangue sono stati raccolti nelle condizioni basali e, successivamente dopo 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 ore dopo la fine della somministrazione della prima infusione di Cy al giorno 1; per il giorno 2, al basale e a 6 ore dopo la fine della seconda infusione di Cy. L'RNA, estratto dalle cellule mononucleate e purificato è stato analizzato utilizzando il *global gene expression* (NimbleGen microarrays, Roche Diagnostics Scandinavia) e l'analisi dei dati col software *Genespring GX* (Agilent). La genotipizzazione dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) rs72547599, rs1056596 e rs66515830 nel gene CYP2J2 è stata condotta mediante Real-time PCR con primers TaqMan (Applied Biosystems, Stockholm, Sweden). I genotipi sono stati assegnati usando ABI PRISM 7500 SDS software version 1.3.1 (Applied Biosystems, Stockholm, Sweden). L'analisi di espressione del gene CYP2J2 è stata condotta mediante *Real-time PCR TaqMan gene expression assay* utilizzando come *housekeeping* il gene GAPDH. Per i controlli sono stati impiegati i donatori sani. Per studiare l'effetto del telmisartan (inibitore del CYP2J2) sulla tossicità indotta da Cy, le cellule HL-60 sono state pre-trattate con telmisartan alla concentrazione di 2,5, 5 o 10 μM per 2 ore e successivamente, è stata aggiunta Cy alla concentrazione di 9 mM per 48 ore. La sopravvivenza cellulare, è stata valutata utilizzando il test della resazurina o mediante l'aggiunta di aceto nitrile (ACN) per l'analisi di 4-OH-Cy. La concentrazione di 4-OH-Cy è stata misurata tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC Agilent, Santa Clara, CA, USA) associata ad un rilevatore di fluorescenza. I dati cinetici sono stati valutati utilizzando Microsoft Excel (Microsoft Sweden, Kista, Sweden) e il software WinNonLin (Certara, Princeton, NJ, USA; standard edition, version 2.0).

Espressione del gene CYP2J2 e genotipi. Dall'analisi di espressione genica condotta sulle cellule del sangue periferico dei pazienti mediante *gene array*, è stato osservato un aumento significativo solo nei livelli di mRNA per CYP2J2. I livelli di espressione genica del CYP2J2 sono stati confermati anche con RT-PCR quantitativa normalizzata con GAPDH. Questi esperimenti hanno dimostrato che l'espressione del gene CYP2J2 era più alta ($P < 0.01$, *t-test*) nei campioni provenienti dai pazienti con neoplasie ematologiche pre-trattati rispetto al gruppo di controllo. L'espressione del gene CYP2J2 era significativamente up-regolata 6 ore dopo la prima infusione di Cy ($P < 0.05$, *t-test*), ridotta a 6 ore dopo la seconda infusione ($P > 0,005$, *t-test*) rispetto al valore ottenuto allo stesso tempo della prima infusione ma più alta rispetto al valore basale. Un'alta variabilità interindividuale nell'espressione genica è stata osservata dopo l'infusione di Cy. La genotipizzazione dei pazienti ha rivelato che solo un paziente era portatore del SNP rs1056596 (A/T) del CYP2J2. Tale paziente presentava una più bassa espressione di CYP2J2 rispetto agli altri pazienti. Sono state poi calcolate le caratteristiche farmacocinetiche di Cy e 4-OH-Cy. La cinetica dei due composti ha rivelato un significativo aumento del rapporto 4-OH-Cy/Cy ($P < 0.01$, *t-test*) a 6 ore dopo la seconda infusione di Cy rispetto alle concentrazioni misurate 6 ore dopo la prima infusione. Inoltre, le concentrazioni di tale rapporto a 6 ore dopo la prima somministrazione e al tempo 0 e 6 ore dopo la seconda infusione risultavano significativamente correlate all'espressione di CYP2J2 ($P < 0.001$, $r^2 = 0.408$). Non è stata osservata nessuna correlazione tra i dati clinici (come diagnosi, tipo di donatore, dose di cellule staminali, ricaduta, remissione, mortalità e complicazioni) e i risultati del CYP2J2.

Ruolo del CYP2J2 nella citotossicità indotta da Cy. La Cy riduce la sopravvivenza cellulare della linea HL-60 in modo tempo e concentrazione dipendente. L'inibitore del CYP2J2, telmisartan, utilizzato a concentrazione $<$ o uguale a 10 μM , non modifica la vitalità delle cellule HL-60; tuttavia concentrazioni più

alte riducono la vitalità cellulare in modo concentrazione dipendente. L'incubazione con telmisartan (10 µM) riduce la formazione del metabolita 4-OH-Cy di circa il 50%. Inoltre, la pre-incubazione con telmisartan (10 µM) aumenta del 10 % la sopravvivenza delle cellule HL-60 trattate con Cy a 9 mM. Risulta pertanto probabile che l'inibitore del CYP2J2 telmisartan sia in grado di ridurre la bioattivazione della Cy e possa aumentare di conseguenza la sopravvivenza delle cellule HL-60.

Il metabolismo di Cy con il gene CYP2J2 ricombinante. L'incubazione di Cy con microsomi contenenti il gene umano CYP2J2 ricombinante mostra il coinvolgimento di questo CYP nella bioattivazione della Cy.

Questo studio è stato progettato per analizzare l'espressione extraepatica del CYP2J2 in pazienti con neoplasie ematologiche ed esaminare il suo ruolo nel metabolismo della Cy. Le analisi di PCR hanno rivelato che, rispetto ad individui sani, il gene CYP2J2 è altamente espresso in tali pazienti prima di essere trattati con Cy. Analogamente alle cellule della linea leucemica, CYP2J2 è stato trovato altamente espresso anche nelle cellule mononucleate presenti nel sangue periferico di pazienti con neoplasie ematologiche. L'analisi *gene array* ha dimostrato che l'espressione del gene CYP2J2 è ulteriormente up-regolata in pazienti in trattamento con Cy, indicando che la sua espressione è indotta dalla Cy. Tuttavia, l'upregulation di CYP2J2 mostra un'ampia variabilità inter-individuale dopo la prima infusione di Cy. La genotipizzazione del polimorfismo rs1056596, ha rivelato che il paziente portatore del genotipo variante aveva una ridotta espressione del gene CYP2J2. A supporto del fatto che CYP2J2 è un CYP importante per la bioattivazione di Cy nell'uomo, l'espressione di CYP2J2 ha mostrato una correlazione positiva con il rapporto di concentrazione 4-OH-Cy/Cy (come misura della bioattivazione di Cy). Come precedentemente riportato, la Cy induce citotossicità nelle cellule HL-60 in modo tempo e concentrazione-dipendente nonostante la ridotta espressione del CYP2B6 o altri enzimi implicati nella bioattivazione della Cy. Nel presente studio, la ridotta formazione del 4-OH-Cy nelle cellule HL-60 indotta da telmisartan e il concomitante incremento della sopravvivenza cellulare, supportano fortemente il ruolo del CYP2J2 nella bioattivazione della Cy. Lo studio in oggetto è il primo a riportare il coinvolgimento del CYP2J2 nel metabolismo della Cy. In conclusione, il presente studio dimostra che il gene CYP2J2 è altamente espresso in pazienti con neoplasie ematologiche e la sua inibizione nelle cellule HL-60 con l'utilizzo del telmisartan influenza la sopravvivenza cellulare; inoltre, la Cy viene metabolizzata nelle cellule HL-60 nonostante la mancata espressione del CYP2B6. Il ruolo del CYP2J2 nel metabolismo della Cy è ulteriormente confermato a seguito dell'incubazione con il gene CYP2J2 ricombinante.

La cinetica enzimatica rivela che CYP2J2 è importante come il CYP2B6 nel metabolismo della Cy ed i relativi livelli di espressione di entrambi i citocromi potrebbero essere di supporto nel determinare la cinetica del farmaco *in vivo*.

Parole chiave: CYP2J2, ciclofosfamide, neoplasie ematologiche, farmacogenetica

Riferimento bibliografico

[El-Serafi I](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2015 Jan 20 [Epub ahead of print].

IMMUNOMODULAZIONE

ASSOCIAZIONE DEL POLIMORFISMO CD58 CON LA SCLEROSI MULTIPLA E LA RISPOSTA ALLA TERAPIA CON INTERFERON β IN UN GRUPPO DI PAZIENTI IRANIANI

A cura della Dott.ssa Donatella Carretta

La sclerosi multipla (*multiple sclerosis*, MS) è una malattia autoimmune e neurodegenerativa in cui il danno della mielina da parte del sistema immunitario determina lesioni focali del sistema nervoso, perdita assonale e atrofia cerebrale. Nell'eziologia della MS sono stati chiamati in causa diversi fattori: infezioni virali, etnia, deprivazione di esposizione al sole, deficienza di vitamina D. Sulla base della localizzazione

dell'infiammazione e della demielinizzazione esistono 5 principali tipi di MS: la MS primaria progressiva (*primary-progressive multiple sclerosis*, PPMS), la MS recidivante remittente (*relapsing remitting multiple sclerosis*, RRMS), la MS secondariamente progressiva (*secondary-progressive multiple sclerosis*, SPMS), la MS recidivante progressiva (*progressive-relapsing multiple sclerosis*, PRMS) e la sindrome clinicamente isolata (*clinically isolated syndrome*, CIS). L'aggregazione familiare, il maggiore rischio di malattia nei familiari di primo, secondo e terzo grado, i matrimoni tra consanguinei, oltre ai risultati di studi su soggetti adottati indicano un ruolo significativo dei fattori genetici nella patogenesi della MS. Il gene *CD58* codifica per una proteina chiamata *lymphocyte function-associated antigen 3* che è espressa sulle cellule che presentano l'antigene (*antigen presenting cells*, APCs), particolarmente sui macrofagi, e favorisce l'attacco delle APCs alle cellule T attraverso il legame ai suoi ligandi specifici presenti sulla superficie delle cellule T. Pertanto, il *CD58* rappresenta un potenziale bersaglio per valutare l'associazione delle sue varianti genetiche con l'autoimmunità nel contesto della patogenesi della MS.

Lo scopo del presente studio è determinare la frequenza degli alleli e dei genotipi relativi al polimorfismo rs12044852 (g.117087779C>A) del *CD58* in una popolazione di pazienti iraniani affetti da MS (RRMS, PPMS, SPMS e CIS) e in un gruppo di soggetti sani di controllo. Il polimorfismo rs12044852 è una delle più importanti varianti del *CD58* che è stata riportata avere una significativa associazione con la MS. Dato l'effetto dell'interferon β (IFN- β) sull'espressione del *CD58*, nel presente studio è stato valutato anche l'effetto della variante sopra menzionata sulla risposta dei pazienti con MS alla terapia con IFN- β protratta per due anni.

Per lo studio sono stati reclutati 200 pazienti con MS ed uno stesso numero di controlli sani omogenei per età (17-70 anni per i pazienti e 13-65 anni per i controlli) e per genere. Nessuno dei controlli o dei loro familiari aveva una storia di MS; i pazienti con altre malattie autoimmuni o malattie genetiche sono stati esclusi dallo studio. La gravità della malattia è stata valutata usando i criteri della *multiple sclerosis severity score* (MSSS). Il polimorfismo rs12044852 A/C nel *CD58* è stato genotipizzato attraverso la PCR-SSP.

Per studiare l'associazione tra il polimorfismo rs12044852 del *CD58* e la risposta farmacologica nei pazienti con MS, un sottogruppo di pazienti è stato trattato con IFN- β per due anni. Tutti i pazienti con RRMS genotipizzati e sottoposti a terapia con IFN- β sono stati visitati ogni tre mesi per due anni. Inoltre, una *expanded disability status scale* (EDSS) e i punteggi MSSS sono stati valutati per ciascun paziente ad ogni visita.

I risultati dello studio hanno mostrato che i genotipi CC e AA erano rispettivamente il più e meno frequente genotipo riscontrato, sia nel gruppo dei pazienti che nei controlli. Tuttavia il genotipo CC era significativamente più frequente nei pazienti con MS rispetto ai controlli ($p=0.001$, OR=2.22), mentre il genotipo AC aveva una frequenza significativamente più alta nel gruppo di controllo. La frequenza del genotipo AA era troppo bassa per essere valutata statisticamente. La frequenza di questi genotipi non era associata a nessuno dei 4 sottogruppi di pazienti. L'assenza di associazione è stata anche riscontrata nella valutazione della gravità della MS, nonostante un punteggio medio MSSS più alto nei pazienti con genotipo CC.

Dei 200 pazienti con MS, 131 erano affetti da RRMS; 120 di questi sono stati trattati con IFN- β per due anni. La risposta al trattamento è stata valutata usando l'EDSS e considerando il numero di episodi di recidive nel periodo di *follow-up*. Tra i 120 pazienti con RRMS trattati con IFN- β , 62 pazienti hanno mostrato una risposta positiva alla terapia. È stato dimostrato che la frequenza del genotipo CC era significativamente più alta nei pazienti *non-responders*. Al contrario, i pazienti con RRMS portatori del genotipo AC avevano la migliore risposta alla terapia con IFN- β . L'analisi del Δ MSSS ha mostrato l'associazione del polimorfismo rs12044852 con la risposta alla terapia con IFN- β nei pazienti con RRMS ($p<0.05$).

Una recente meta-analisi sull'associazione tra il polimorfismo rs12044852 e la MS ha introdotto questa variante come un maggiore fattore di rischio, in particolare nella popolazione Caucasica. Tuttavia, questa associazione non è stata ritrovata in alcune altre popolazioni come quella degli Africani Americani. Nel presente studio, basato su 200 pazienti ed un equivalente numero di soggetti sani di controllo, è stata osservata una forte associazione tra i genotipi e gli alleli di questo polimorfismo del *CD58* e la suscettibilità alla MS. Un'ulteriore conferma di questa associazione proviene da uno studio di 1077 pazienti Svedesi con MS confrontati con 10277 controlli; i risultati di questo studio hanno incentivato studi su altre popolazioni quali quella Canadese, Tedesca e della Nuova Zelanda confermando il ruolo di questa variante su campioni di dimensione più ampie.

Data l'importanza del *CD58* nella modulazione della funzione immunitaria e l'associazione del rs12044852 con la MS confermata ancora una volta in questo studio, gli Autori hanno deciso di determinare per la prima volta l'impatto di questa variante sull'efficacia della terapia con IFN- β in maniera prospettica. Considerata l'*up-regulation* del *CD58* in risposta alla terapia con IFN- β , sembra che rs12044852 possa interferire con l'espressione di questo gene determinando una migliore risposta alla terapia con IFN- β . Data la significativa associazione tra il polimorfismo rs12044852 e la risposta alla terapia con IFN- β , la genotipizzazione dei pazienti con MS prima dell'inizio del piano terapeutico potrebbe avere effetti critici sulla sopravvivenza e sulla qualità di vita dei pazienti. Il chiarimento e la conferma dell'effetto del polimorfismo rs12044852 sull'efficacia della terapia con IFN- β in un campione più ampio di pazienti potrebbe aprire la strada ad una medicina personalizzata e migliorare la qualità di vita dei pazienti con MS.

In conclusione, il presente studio ha rilevato una forte associazione del polimorfismo rs12044852 del gene *CD58* con la sclerosi multipla ed un suo impatto significativo sulla risposta alla terapia con interferon- β nei pazienti con sclerosi multipla recidivante-remittente.

Ulteriori studi saranno necessari per chiarire la patologia molecolare di tale polimorfismo, responsabile di una peggior prognosi nei pazienti con MS, specie in risposta alla terapia con IFN- β .

Parole chiave: sclerosi multipla, CD58, polimorfismo, interferon- β , risposta

Riferimento bibliografico

[Torbati S](#) et al. *Cell J* 2015, 16: 506-13.

VARIAZIONI GENETICHE NEL GENE APOPTOTICO BCL2L1 AUMENTANO LA RISPOSTA AL TRATTAMENTO BASATO SULL'INTERFERONE IN PAZIENTI CON INFEZIONE DA VIRUS DELL'EPATITE C DI GENOTIPO 3

A cura della Dott.ssa Giulia Sammarini

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) ha un notevole impatto socio-economico, con circa 170 milioni di pazienti cronici e 350 mila decessi annui. L'apoptosi è uno dei possibili meccanismi con cui il sistema immunitario si difende dalle infezioni virali. Il processo di morte programmata può essere attivato tramite via estrinseca o intrinseca. La via intrinseca, oggetto di questo studio, è indotta dai mitocondri in seguito a danno al DNA, a stress ossidativo e a infezioni virali. La via intrinseca viene amplificata dai geni pro-apoptotici (*Bax*, *Bak*, *Bad*, *Box*), mentre le proteine come cellule-B linfoma 2 (BCL2) e cellule-B linfoma 2-like 1 (BCL2L1) sono anti-apoptotiche. Queste due proteine convergono al *poro di transizione mitocondriale* che regola il rilascio delle proteine regolatrici dell'apoptosi. La proteina ligando correlata al recettore dei glucocorticoidi (GITRL) che induce il TNF (fattore di necrosi tumorale) è un membro di recente identificazione della superfamiglia dei recettori TNF e la sua interazione con GTR aumenta l'apoptosi influenzando la via intrinseca, probabilmente tramite le cellule natural killer (NK) che provocano l'inibizione di BCL2L1. Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) nei geni GITRL, CD27BP, BCL2L1, BCL2, appartenenti al *pathway* intrinseco dell'apoptosi, ipotizzando che questi potessero influenzare la risposta virologica prolungata (SVR).

I pazienti sono stati trattati con interferone- α pegilato/ribavirina (pegIFN/RBV). L'interferone- α pegilato è stato somministrato settimanalmente; RBV con dosi giornaliere, aggiustando la dose in base al peso per i pazienti con genotipo HCV di genotipo 1 e utilizzando una "dose flat" per i pazienti con HCV di genotipo 3. Il trattamento ha avuto una durata pianificata di 48 settimane per i genotipi 1 e 24 settimane per i 3. La risposta virologica prolungata (SVR) è stata definita come livelli plasmatici non rilevabili di HCV RNA a 24 settimane dalla fine del trattamento. Gli SNPs sono stati selezionati secondo i seguenti criteri: SNPs non sinonimi con frequenza nota nella popolazione europea; SNPs sinonimi localizzati nelle regioni codificanti e la cui frequenza è minore del 5% nella popolazione bianca europea; SNPs sinonimi localizzati fuori dalle regioni esoniche presenti con una frequenza maggiore del 25% nella popolazione bianca europea.

Lo studio ha coinvolto 201 europei bianchi (132 maschi e 69 femmine), di cui 117 hanno raggiunto una SVR (58%), mentre 84 non sono risultati responsivi al trattamento. Il 46% dei pazienti con genotipo 1 di HCV (n=100) ha avuto SVR, rispetto al 70% dei pazienti con genotipo 3 (n=101). Dei 30 SNPs analizzati, dopo esclusione di 10 SNPs risultati monomorfici, 1 in disequilibrio di Hardy-Weinberg e 3 SNPs non determinati, 16 SNPs sono risultati idonei per l'analisi con un call rate maggiore di 95%. Di questi 16, 4 SNPs sono risultati associati a SVR, tutti appartenenti al gene BCL2L1 ed in *linkage* fra loro; tra questi rs1484994 è risultato il più significativo a livello statistico. Per i pazienti portatori del genotipo 1 di HCV, il tasso di SVR è risultato maggiore per coloro che presentavano il genotipo BCL2L1 rs1484994 CC e IL28B rs12979860 CC rispetto ai non CC (83% e 70% rispettivamente). Degli individui con genotipo 3 di HCV (n=5), tutti i portatori del genotipo BCL2L1 rs1484994 CC avevano mostrato SVR. In un modello di regressione logistica multivariata, i portatori dell'allele rs1484994 C (TC+CC) con HCV di genotipo 3 sono risultati avere una maggiore probabilità di SVR rispetto ai portatori del genotipo rs1484994 TT (OR: 3.4, 95%CI 1.2-9.8, P=0.02). L'effetto di rs1484994 risulta simile nei pazienti con HCV di genotipo 1, ma non viene raggiunta la significatività statistica (OR: 2.2, 95%CI 0.8-5.9, P=0.1).

Questi risultati suggeriscono un ruolo importante del gene BCL2L1, appartenente al *pathway* della via intrinseca dell'apoptosi, nella risposta al trattamento con pegIFN/RBV. Studi precedenti avevano evidenziato negli individui con SVR una maggiore attività apoptotica sia prima che durante il trattamento, rispetto agli individui non responsivi o con ricaduta. Inoltre, è stato precedentemente osservato una maggiore espressione del gene anti-apoptotico BCL2 in individui non responsivi al trattamento con pegIFN/RBV. Dato che l'interferone stimola l'apoptosi e che polimorfismi del gene BCL2L1 possono influenzare la risposta al trattamento con pegIFN/RBV, gli Autori suggeriscono che il livello di apoptosi indotto dall'interferone possa essere influenzato da polimorfismi nel gene BCL2L1. A tale riguardo, occorre tuttavia sottolineare che tutti i polimorfismi identificati in questo studio, tra cui rs1484994, sono localizzati in regioni non codificanti entro 51 kilobasi dall'introne 1. Pertanto, gli Autori ipotizzano che l'effetto dei polimorfismi identificati sulla SVR possa essere dovuto a *linkage* con varianti geniche funzionali localizzate nella regione promoter o in siti di *splicing*. Ulteriori studi sono pertanto necessari per meglio comprendere il ruolo delle varianti del gene BCL2L1 nella risposta al trattamento con pegIFN/RBV.

In conclusione, questo studio evidenzia che polimorfismi nel gene BCL2L1, appartenente al *pathway* intrinseco dell'apoptosi, possano influenzare la risposta al trattamento con pegIFN/RBV in pazienti con HCV di genotipo 3.

Parole chiave: apoptosi nel trattamento di HCV; interazioni fra interferone e apoptosi; predizione di una risposta virologica prolungata

Riferimento bibliografico

Clausen LN et al. *Int J Mol Sci* 2015, 16(2): 3213-25.

POLIMORFISMI DEL GENE DEL RECETTORE DEI GLUCOCORTICOIDI E DEL GLUCOCORTICOID-INDUCED TRANSCRIPT 1 SONO ASSOCIATI ALLA GRAVITA' DELLA PATOLOGIA E ALLA RISPOSTA DELLA TERAPIA PONTE CON GLUCOCORTICOIDI NELL'ARTRITE REUMATOIDE

A cura delle Dott.sse Alessia Di Silvestre e Marianna Lucafò

L'artrite reumatoide (RA) è una patologia autoimmune caratterizzata da un'infiammazione cronica della membrana sinoviale che se non trattata può portare alla perdita della funzionalità articolare. I glucocorticoidi (GC) sono farmaci largamente utilizzati nel trattamento dell'RA e sono prescritti soprattutto per quella che viene definita terapia ponte, vale a dire una terapia applicata prima dell'assunzione di farmaci antireumatici modificanti la malattia (DMARD). Si è dimostrato che una scarsa risposta iniziale alle terapia ponte con GC è indice di una mancata risposta ai DMARD, valutata con tre mesi di follow-up. Quindi questi dati dimostrano l'importanza della risposta primaria del trattamento con GC e sottolineano la necessità di ricercare dei marker per predire la sensibilità ai GC.

Lo scopo di questo studio è di comprendere se la presenza di polimorfismi sui geni del recettore dei

glucocorticoidi (GR) e sul gene *glucocorticoid-induced transcript 1* (GLCCI1) può essere associata all'attività della patologia e agli effetti della terapia ponte con GC. Studi recenti hanno dimostrato che l'allele T della SNP rs37972 del gene GLCCI1 è associato ad una minore efficacia della terapia con GC in pazienti asmatici, e quindi si è ipotizzato che questi risultati possano essere applicati anche nei pazienti con artrite reumatoide. Inoltre sono stati presi in considerazione quattro polimorfismi del gene GR (9 β , ER22/23EK, BcII e N363S) che risultano associati alla sensibilità ai GC e che potrebbero spiegare la variabilità nella risposta clinica osservata nei pazienti con RA. E' stato effettuato uno studio prospettico su un totale di 138 pazienti dei quali 73 sono stati trattati con GC somministrato oralmente (15 mg/die di prednisone) e 65 con GC per via intramuscolare (120 mg meliprednisolone in singola dose). Tutti i pazienti sono stati genotipizzati per i polimorfismi di GR e la variante di GLCCI1 e divisi in due gruppi: polimorfismi associati all'aumento della sensibilità ai GC (BcII-G, N363S-G, GLCCI1-C) e polimorfismi associati a una diminuzione della sensibilità (9 β -G, ER22/23EK-A/A, GLCCI1-T). In questo studio tali polimorfismi sono stati correlati all'indice di attività della malattia (DAS).

I risultati mostrano che i pazienti del gruppo GC-I (portatori del polimorfismo 9 β allele G, aplotipo 3, o polimorfismo 9 β allele G + ER22/23EK allele A/A, aplotipo 4) e GC-II (gruppo GC-I + portatori di uno o due alleli GLCCI1) e portatori dell'allele T in GLCCI1 hanno un DAS al *baseline* più alto rispetto agli altri polimorfismi o ai rispettivi *wild-type*.

Inoltre i risultati ottenuti sono stati correlati con la risposta clinica osservata in seguito alla terapia ponte con GC per due settimane di trattamento e si è osservata una diminuzione di DAS in tutti i pazienti (in media il 30.2%); le due diverse forme di somministrazione mostrano risultati simili in termini di DAS nei GC per via orale (in media 32%) e nei GC per via intramuscolare (in media 28,3%); ed infine si nota una differenza significativa tra pazienti di sesso maschile e quelli di sesso femminile con una diminuzione del 38,6% e del 25,1%, rispettivamente. Inoltre è stata osservata un'associazione genere specifica per il genotipo di GLCCI1, che è risultato collegato ad un netto miglioramento del DAS in pazienti maschi con RA, e non per GR. Per la prima volta è stato dimostrato, che la variante mutata di GLCCI1 (rs37972) è associata con una maggiore gravità della malattia e di conseguenza con una minore risposta clinica alla terapia ponte con GC, nei pazienti maschi.

In conclusione questo lavoro ha mostrato che GLCCI1 potrebbe essere considerato un marker di predizione per la sensibilità ai GC, ma chiaramente questi risultati richiedono un'ulteriore validazione considerando una coorte più ampia di pazienti affetti da artrite reumatoide. Inoltre, i polimorfismi di GR e GLCCI1 essendo associati all'attività della malattia al baseline, potrebbero suggerire ripercussioni anche a livello del cortisolo endogeno, influenzando, di fatto, l'effetto dei GC esogeni.

Parole chiave:

Artrite reumatoide, Sensibilità ai glucocorticoidi, Polimorfismi del gene del recettore dei glucocorticoidi, Polimorfismi del gene *glucocorticoid-induced transcript 1*

Riferimento bibliografico

[Quax RA](#) et al. *Rheumatol Int* 2015 Feb 28 [Epub ahead of print].

DISMETABOLISMI**UNO STUDIO DI ASSOCIAZIONE GENOME-WIDE IDENTIFICA ABCG2 (BCRP) COME TRASPORTATORE DELL'ALLOPURINOLO E FATTORE GENETICO PREDITTIVO DELLA RISPOSTA AL FARMACO**

A cura della Dott.ssa Sarah Carginin

La gotta è una patologia dismetabolica caratterizzata da iperuricemia e conseguente deposito di cristalli di acido urico a livello delle articolazioni. La gotta ha una prevalenza del 2% circa nella popolazione generale e costituisce la forma più comune di artrite infiammatoria nei paesi occidentali. Attualmente, l'allopurinolo rappresenta il farmaco di prima linea per il trattamento e la prevenzione della gotta. Si tratta di un analogo purinico dell'ipoxantina che viene metabolizzato ad ossipurinolo. Entrambi i composti (allopurinolo e ossipurinolo) agiscono riducendo i livelli sierici di acido urico tramite l'inibizione dell'enzima xantina ossidasi, deputato alla conversione delle xantine in acido urico. Tuttavia, solo il 42% circa dei pazienti in trattamento con allopurinolo risponde al trattamento, raggiungendo l'obiettivo terapeutico della riduzione dei livelli sierici di acido urico al di sotto dei 6mg/dl. Gli obiettivi di questo studio sono stati: i) identificare, tramite uno studio di associazione *genome-wide* (GWAS), potenziali varianti genetiche correlate alla risposta al trattamento con allopurinolo in un'ampia coorte multi-etnica di pazienti affetti da gotta; ii) testare, tramite esperimenti *in vitro*, il meccanismo biologico attraverso il quale le varianti identificate nello studio GWAS possono influenzare la risposta alla terapia con allopurinolo.

Questo studio di associazione *genome-wide* è stato condotto su un sottogruppo di pazienti appartenenti alla coorte GERA (*Genetic and Epidemiology Research on Adult and Aging cohort*) all'interno del progetto "Kaiser Permanente Research Program on Genes, Environment, and Health (RPGEH). La coorte GERA è composta da 110.266 soggetti adulti per i quali sono disponibili informazioni dettagliate relative al consumo di farmaci (database elettronico delle prescrizioni di farmaci), ai risultati di test di laboratorio e alle diagnosi cliniche ricevute. L'81% di tali pazienti è di etnia bianca non-ispánica mentre il restante 19% è costituito da pazienti asiatici (7%), afro-americani (3,5%), latino-americani (7%) e di altre etnie (1,5%). Sono stati inclusi nello studio tutti i pazienti con almeno una prescrizione di allopurinolo nel periodo in studio e di cui fossero disponibili i dati relativi ai livelli sierici di acido urico misurati prima e dopo il trattamento con allopurinolo. Per i pazienti eleggibili per lo studio sono stati inoltre raccolti i dati relativi a: sesso, età al momento della misurazione dei livelli di acido urico, BMI, dose di allopurinolo assunta e concomitante assunzione di diuretici e uricosurici. Il DNA germinale dei partecipanti allo studio è stato estratto da saliva e la genotipizzazione dei campioni è stata condotta tramite Affymetrix Axiom arrays specifici per le diverse etnie.

I pazienti eleggibili per lo studio erano 2027 (di cui il 75% di sesso maschile), di età media di 68 anni al momento del trattamento con allopurinolo. I livelli sierici medi di acido urico al baseline erano di 8.9 mg/dl, un valore indicativo di iperuricemia. Il 79,3% dei pazienti (N=1607) era di etnia bianca non-ispánica, l'11,7% (N=238) di origine asiatica, il 4,1% (N= 84) di origine afro-americana e il 4,2 (N=85) di etnia latino-americana. Dei 1607 soggetti di etnia bianca non-ispánica, 1492 sono stati genotipizzati con il medesimo array. Dall'analisi statistica, condotta sul campione omogeneo di 1492 pazienti di origine caucasica, sono emerse 8 varianti genetiche statisticamente associate alla risposta al trattamento con allopurinolo dopo correzione per test multipli ($P < 5 \times 10^{-6}$). Di queste varianti, lo SNP rs10011796 del gene ABCG2 è risultato essere il più fortemente associato all'*endpoint* in studio ($P=2,0 \times 10^{-8}$). Tra le altre, la variante funzionale del gene ABCG2 rs2231142 (Q141K) è emersa associata ad una peggiore risposta ad allopurinolo ($P=1,9 \times 10^{-6}$; LD con rs10011796: $r^2=0,078$). Tuttavia, dopo meta-analisi dei risultati ottenuti nei diversi sottogruppi etnici, solo l'associazione tra la variante ABCG2 rs2231142 e la risposta ad allopurinolo è risultata essere statisticamente significativa (rs2231142: $P=3,4 \times 10^{-7}$; rs10011796: $P=6,9 \times 10^{-4}$). Il gene ABCG2 codifica per la proteina BCRP, un trasportatore di efflusso dell'acido urico. Sulla base dei risultati ottenuti dallo studio GWAS, gli Autori hanno ipotizzato che il trasportatore BCRP fosse implicato nel trasporto cellulare di allopurinolo/ossipurinolo e che la variante funzionale ABCG2 rs2231142 (Q141K) potesse influenzare l'attività del trasportatore. Al fine di chiarire il ruolo del trasportatore BCRP nell'efflusso a livello cellulare di allopurinolo/ossipurinolo, è stato condotto un saggio di citotossicità su cellule stabilmente trasfettate esprimenti BCRP, usando mitoxantrone, un substrato noto di BCRP. Come atteso, le cellule esprimenti BCRP *wild-type* (141Q) risultavano essere le più resistenti, seguite da quelle con la variante 141K ed, infine, da quelle che non esprimevano il trasportatore. Dopo incubazione con allopurinolo e ossipurinolo delle cellule esprimenti BCRP e di quelle non esprimenti BCRP, si è evidenziato un minor accumulo dei due farmaci a livello delle cellule esprimenti BCRP rispetto a quelle che non esprimevano il trasportatore. L'aggiunta di un inibitore specifico di BCRP (ko-143) ha inoltre indotto un aumento significativo dell'accumulo di allopurinolo nelle cellule esprimenti il trasportatore, supportando così ulteriormente l'ipotesi che BCRP fosse un trasportatore di efflusso dell'allopurinolo e del suo metabolita. Inoltre, le cellule esprimenti BCRP con la variante 141K, mostravano un maggiore accumulo di allopurinolo e del suo

metabolita a livello cellulare rispetto alle cellule BCRP *wild type* (141Q), suggerendo come la variante 141K potesse ridurre l'attività del trasportatore.

Questo studio di associazione *genome-wide* ha identificato, per la prima volta, la correlazione tra varianti del gene ABCG2 e la risposta al trattamento con allopurinolo. Il gene ABCG2 codifica per la proteina di resistenza al cancro al seno (BCRP) dei trasportatori ABC (*ATP-binding cassette*). Essendo noto il ruolo di BCRP nel trasporto di acido urico e di numerosi derivati purinici, è stato ipotizzato dagli Autori che anche l'allopurinolo e il suo metabolita, entrambi analoghi purinici, fossero substrati di quel trasportatore. Tuttavia, non essendo noti i livelli plasmatici di allopurinolo e ossipurinolo nei pazienti in studio, non è stato possibile definire con precisione il meccanismo biologico attraverso il quale la variante ABCG2 rs2231142 possa ridurre la risposta al trattamento con allopurinolo. A tale proposito, gli autori dello studio hanno ipotizzato che l'allopurinolo e l'ossipurinolo possano esplicare il loro effetto terapeutico non solo inibendo l'attività dell'enzima ossidasi ma anche aumentando l'escrezione renale di acido urico, mediata da trasportatori quali il BCRP. Ulteriori studi finalizzati ad indagare il ruolo di rare varianti funzionali del gene ABCG2 potrebbero migliorare la comprensione del meccanismo molecolare attraverso cui il gene ABCG2 influenzi la risposta al trattamento con allopurinolo in pazienti affetti da gotta.

Le varianti rs10011796 ed rs2231142 del gene ABCG2 sono correlate alla risposta al trattamento con allopurinolo in una coorte di pazienti bianchi non ispanici affetti da gotta. Inoltre, il polimorfismo rs2231142 determina una riduzione dell'attività del trasportatore BCRP dell'allopurinolo.

Parole chiave: allopurinolo, gotta, ABCG2

Riferimento bibliografico

[Wen CC](#) et al. *Clin Pharmacol Ther* 2015 Feb 9 [Epub ahead of print].

NEUROLOGIA

ANALISI DI NETWORK DI ESPRESSIONE GENICA CONDOTTA SU SANGUE PERIFERICO SUGGERISCE IL COINVOLGIMENTO DI MTOR E NF-KB NELL'INSORGENZA DI SINTOMI EXTRAPIRAMIDALI INDOTTI DA ANTIPISICOTICI

A cura del Dott. Alessio Squassina

Numerose evidenze supportano il coinvolgimento di varianti geniche nel modulare la variabilità nella risposta agli antipsicotici (AP) e nell'insorgenza di effetti avversi ad essi correlati nei pazienti schizofrenici. Tuttavia, nonostante diversi studi abbiano riportato associazione tra mutazioni geniche localizzate nei recettori dopaminergici D2 e D3 e la risposta agli AP, a oggi non sono ancora disponibili test genetici predittivi affidabili. Finora, la maggior parte degli studi di farmacogenetica degli AP è stata condotta utilizzando l'approccio di geni candidati. I risultati di questi studi sono stati soltanto raramente replicati in studi indipendenti o in metanalisi. Tale incongruenza è in parte dovuta al fatto che la selezione dei geni oggetto dello studio si basa sul meccanismo d'azione noto del farmaco. Tuttavia, la conoscenza attuale sulla farmacocinetica e farmacodinamica degli antipsicotici è ancora limitata. Il limite imposto dall'approccio di geni candidati porrebbe pertanto essere superato utilizzando approcci che integrino informazioni provenienti da diverse fonti di dati, come per esempio dati di sequenza e dati di espressione genica, e da analisi di network. Sulla base di queste considerazioni, gli autori di questo studio hanno condotto una analisi di espressione *genome wide* su sangue periferico di 18 pazienti schizofrenici *drug-naive* al primo episodio psicotico e successivamente trattati con risperidone o paliperidone, allo scopo di identificare geni alterati dal trattamento farmacologico e valutare se i network costituiti da tali geni fossero correlati all'insorgenza di effetti extrapiramidali (EP) indotti dalla terapia.

Il campione dello studio includeva 12 pazienti con diagnosi di schizofrenia secondo il DSM-IV, tutti di

origine caucasica e residenti in Catalogna. Per ogni paziente erano disponibili due prelievi di sangue: uno effettuato al reclutamento, e uno dopo 9 giorni di terapia continuativa con AP o all'insorgenza di sintomi EP e prima del trattamento con farmaci antiparkinsoniani. Durante questo periodo i pazienti non avevano assunto alcun altro tipo di trattamento. I sintomi EP acuti causati da trattamento con AP erano stati valutati tramite Simpson-Angus Scale e monitorati per 4 settimane. Dopo il trattamento, otto partecipanti avevano presentato sintomi EP, nello specifico distonia acuta (N=5) e parkinsonismo farmaco-indotto (N=3). Due partecipanti erano stati esclusi dallo studio poiché trattati con farmaci antiparkinsoniani nel periodo precedente al secondo prelievo di sangue. In totale, lo studio ha incluso sei pazienti senza sintomi EP e sei con sintomi EP, matchati per età, sesso, utilizzo di cannabis, fumo, trattamento AP e dosaggio. L'RNA estratto dal sangue dei 12 pazienti è stato quindi utilizzato per lo studio di espressione condotto con Human Genome U219 Array Plate (Affymetrix), un *microarray* che contiene più di 530.000 *probes* che coprono circa 36.000 trascritti per 20.000 geni. I dati sono stati analizzati in tre step: una prima analisi *gene-based*, con l'obiettivo di identificare i geni alterati dal trattamento con AP e differenzialmente espressi tra pazienti che avevano presentato sintomi EP e non; una seconda analisi di *protein-protein interaction*, con l'obiettivo di identificare i network di proteine codificate dai geni differenzialmente espressi nell'analisi precedente, associati al trattamento e all'insorgenza di sintomi EP; la terza analisi di *gene-set enrichment*, con l'obiettivo di dare un'interpretazione funzionale ai network generati dall'analisi precedente tramite l'identificazione di set di geni che costituiscono nodi funzionali comuni a pazienti con e senza sintomi EP o specifici di ognuno dei due gruppi.

I risultati della prima analisi non hanno evidenziato differenze significative tra pazienti con e senza sintomi EP, né al basale né dopo trattamento con AP. Tuttavia, quando gli autori hanno considerato l'effetto del trattamento con AP, 81 geni sono risultati differenzialmente espressi tra prima e dopo il trattamento nel gruppo dei pazienti con sintomi EP e 121 nel gruppo dei pazienti senza sintomi EP. Tra questi, 50 geni erano alterati in entrambi i gruppi. L'analisi di interazione di proteine basata su questi geni ha identificato un network costituito da 432 prodotti genici che includeva 101 dei 121 geni alterati dal trattamento con AP nei soggetti che non presentavano sintomi EP, mentre il network di proteine nei soggetti che presentavano sintomi EP era costituito da 231 prodotti genici e includeva 64 degli 81 geni alterati dal trattamento con AP. L'analisi gene-set ha evidenziato in totale sette gruppi differenti di processi biologici (*gene ontology*) nei quali erano raggruppati i geni influenzati dal trattamento con AP in entrambi i gruppi con e senza sintomi EP. I pazienti che non presentavano sintomi EP correlavano significativamente con termini di *gene ontology* associati con la sintesi e il trasporto di ATP, e con i *pathway* dell'ubiquitina e *protein folding*, mentre i pazienti che presentavano sintomi EP correlavano con termini associati ai recettori insulinici e al metabolismo lipidico, e con i *pathway* di NF- κ B e mTOR/AMPK.

Lo studio ha pertanto identificato network di interazione di geni e proteine potenzialmente coinvolti nell'insorgenza di sintomi EP indotti da AP nella schizofrenia. Diversi *pathway* identificati in questo studio costituiscono bersagli a valle della via AKT, una chinasi già dimostrata essere coinvolta nella schizofrenia e nella risposta agli AP. Una disregolazione dei sistemi correlati all'ubiquitina era stata già supportata da precedenti studi post-mortem. Inoltre, diversi studi hanno riportato alterazioni a carico dei sistemi di *protein folding* nella schizofrenia. Il *pathway* di NF- κ B, identificato come over-rappresentato esclusivamente nel gruppo dei pazienti con sintomi EP dopo trattamento con AP, è coinvolto nell'infiammazione ed è responsabile della regolazione dell'espressione di un elevato numero di geni implicati nella sopravvivenza neuronale, nella plasticità sinaptica e nella memoria nel cervello adulto. Il secondo *pathway* che gli autori hanno identificato come over-rappresentato esclusivamente nel gruppo di pazienti con sintomi EP, era mTOR, coinvolto nella biosintesi dei lipidi, nel metabolismo del glucosio e nell'autofagia. mTOR è un regolatore chiave della crescita e metabolismo cellulare ed è coinvolto nella modulazione dell'attività dell'insulina e di diversi fattori di crescita.

I geni afferenti ai *pathway* identificati da questo studio potranno costituire nuovi bersagli di studi di farmacogenetica sugli AP. In particolare, i *pathway* mTOR e NF- κ B, e conseguentemente i geni che ne fanno parte, sembrano giocare un ruolo fondamentale nell'insorgenza di sintomi EP in pazienti schizofrenici trattati con AP. Inoltre, questo studio supporta l'efficacia dell'utilizzo di campioni di sangue periferico per identificare alterazioni di network funzionalmente correlati a importanti processi del sistema nervoso centrale che potrebbero essere coinvolti nella risposta agli AP e nell'insorgenza di sintomi EP.

Parole chiave: risperidone, paliperidone, sintomi extrapiramidali, schizofrenia, espressione genica

Riferimento bibliografico

[Mas S](#) et al. *Pharmacogenomics J* 2015 Jan 27 [Epub ahead of print].

CARDIOVASCOLARE

LA FARMACOGENETICA DEL WARFARIN NELLA POPOLAZIONE CINESE

A cura della Dott.ssa Valeria Conti

Il warfarin è un farmaco ampiamente utilizzato nella terapia anticoagulante orale (TAO) dei pazienti con fibrillazione atriale e tromboembolismo venoso e rappresenta il trattamento di prima linea nei pazienti sottoposti a intervento di sostituzione di valvola cardiaca.

Il warfarin è un farmaco poco maneggevole ed esiste una grande variabilità inter-individuale nella risposta terapeutica. Infatti, ci sono individui, che sulla base del loro genotipo, richiedono dosi più basse o più alte di farmaco per ottenere un effetto anticoagulante adeguato. Nel 2007 la FDA ha rilevato la necessità di prendere in considerazione alcuni polimorfismi coinvolti nella farmacodinamica e farmacocinetica del warfarin per pianificare il regime terapeutico più idoneo per ogni paziente. I polimorfismi nei geni VKORC1 e CYP2C9 giocano il ruolo più importante nell'influenzare la risposta terapeutica, ma, accanto alla variabilità inter-individuale, esiste un'ampia variabilità inter-etnica che riguarda le frequenze alleliche di tali polimorfismi e l'effetto che essi hanno sugli esiti clinici della TAO.

In questo studio sono stati analizzati cinque SNP: rs9923231 (VKORC1), rs7294 (VKORC1), rs1057910 (CYP2C9), rs2108622 (CYP4F2) e rs699664 (gamma-glutamyl carbossilasi dipendente dalla vitamina K, GGCX) ed è stata valutata l'associazione tra tali polimorfismi e il valore di INR (International Normalized Ratio) e tra di essi e la concentrazione plasmatica di warfarin in una popolazione di pazienti cinesi che avevano subito un intervento di sostituzione di valvola cardiaca.

I criteri d'inclusione erano l'assunzione di warfarin per almeno tre mesi consecutivi; l'assenza di assunzione di altri farmaci potenzialmente influenzanti la farmacocinetica e la farmacodinamica del warfarin; nessuna evidenza di disfunzione renale o epatica; nessuna evenienza di trombosi o emorragia durante la terapia con warfarin. Sono stati arruolati 220 pazienti e per ciascuno di essi sono state collezionate (tramite la somministrazione di un questionario) informazioni di tipo demografico e sulla dose di mantenimento. Campioni di sangue e plasma sono stati collezionati 12 ore dopo l'ultima assunzione di farmaco; per ciascun paziente sono stati determinati i valori di PT (tempo di protrombina) e di INR; inoltre, sono state determinate le concentrazioni plasmatiche di warfarin mediante UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*). L'estrazione dei campioni di DNA è stata eseguita tramite kit commerciale (Qiagen, UK) e l'analisi di genotipizzazione, previa amplificazione dei frammenti genici contenenti gli SNP prescelti, è stata eseguita tramite piro-sequenziamento con la strumentazione *PyroMarkQ96 ID Instrument* (Qiagen, Germany).

Le frequenze alleliche registrate per ciascuno dei cinque SNP erano in equilibri di Hardy-Weinberg ed erano comparabili a quelle riportate in altre popolazioni di origine cinese. Su un totale di 220 pazienti, 158 individui avevano valori di INR che ricadevano nell'intervallo terapeutico (1,5-2,5). I pazienti omozigoti AA per lo SNP VKORC1 rs9923231 e gli omozigoti CC *wild type* per lo SNP VKORC1 rs7294 richiedevano una dose di mantenimento più bassa degli individui eterozigoti, AG e TC.

La dose di mantenimento richiesta era, inoltre, più bassa anche per gli eterozigoti CYP2C9 rs1057910. Nei pazienti portatori degli SNP CYP4F2 rs2108622 e GGCX rs699664 non è stata trovata nessuna differenza.

L'analisi di associazione tra SNPs e le concentrazioni plasmatiche di warfarin è stata condotta in soli 130 soggetti e le differenze statisticamente significative sono state registrate solo per i polimorfismi rs9923231 e rs7294, che erano, infatti, associati a una riduzione delle concentrazioni plasmatiche di anticoagulante. Tuttavia, dall'analisi dell'effetto delle varianti sulla dose di mantenimento e la concentrazione plasmatica del

farmaco è emerso che gli SNP rs9923231 e rs1057910 influenzavano maggiormente il raggiungimento della dose stabile (come nei Caucasicci), invece, per quanto riguarda l'associazione tra gli SNP e la concentrazione di warfarin, solo la variante rs7294 esercitava un'influenza essendo responsabile del 26,7% della variabilità osservata.

L'assenza di associazione tra la concentrazione plasmatica di anticoagulante e il polimorfismo CYP2C9 rs1057910 può dipendere dal numero basso di pazienti sui quali è stata eseguita l'analisi. I pazienti portatori dell'allele A avevano una concentrazione plasmatica di warfarin inferiore rispetto agli altri individui a parità di dose di mantenimento, ma le differenze non raggiungevano la significatività statistica.

Questo studio sulla popolazione Cinese ha confermato l'influenza esercitata dagli SNP VKORC1 rs9923231 e CYP2C9 rs1057910 sulla variabilità di risposta alla terapia anticoagulante con warfarin.

Nel gene VKORC1 il polimorfismo rs9923231 (-1639 G>A) è il più comune, ma nei Caucasicci GG è il genotipo più frequente, mentre nei Cinesi è AA. Inoltre, lo SNP rs7294 (3730 G>A) è poco rappresentato nella popolazione Cinese.

In conclusione, questo studio ha rimarcato l'esistenza di una variabilità inter-etnica, oltre a quella inter-individuale, nella risposta alla TAO con warfarin. Tuttavia, come nei Caucasicci, anche nei Cinesi l'allele mutato A dello SNP VKORC1 rs9923231 ha un ruolo preponderante nel determinare la variabilità della risposta al warfarin aumentando la sensibilità del paziente alla terapia e rendendo necessarie dosi di farmaco più basse e, al contrario, l'allele mutato T dello SNP VKORC1 rs7294 è associato alla richiesta di dosi più alte di farmaco. Inoltre, il polimorfismo CYP2C9 rs1057910 è associato a una riduzione del metabolismo del warfarin e gli individui portatori dell'allele C richiedono dosi di mantenimento inferiori rispetto ai *wild type*. L'ampliamento della conoscenza delle varianti genetiche influenzanti la variabilità della risposta al warfarin contribuirà a costruire algoritmi farmacogenetici sempre più efficaci a garantire l'effetto anticoagulante adeguato a ogni paziente.

Parole chiave: warfarin, variabilità inter-etnica, dose di mantenimento, INR

Riferimento bibliografico

[Li S](#) et al. *PLoSOne* 2015, 10(1): e0116463.

LA METANALISI DEL MESE

STUDIO DI META-ANALISI SUL RUOLO PREDITTIVO DELLE MUTAZIONI DI BRAF IN PAZIENTI CON CANCRO DEL COLON RETTO AVANZATO IN TERAPIA CON CETUXIMAB E PANITUMUMAB

A cura del Dott. Vittorio Simeon

Le mutazioni attivanti di BRAF, prevalentemente V600E, comprendono un sottogruppo di pazienti con cancro del colon retto (CRC) ben definito dal punto di vista molecolare (8-10%). Questa tipologia di tumore ha un'incidenza più alta nelle donne anziane ed è spesso associata a CRC con istotipo mucinoso ad alto grado, instabilità dei microsatteliti, fenotipo metilatore e alta frequenza di metastasi peritoneali e linfonodali. La scelta della miglior opzione terapeutica per i pazienti con CRC avanzato mutato per BRAF è tutt'oggi in discussione. È stato infatti dimostrato che la mutazione BRAF V600E è correlata ad un fenotipo estremamente aggressivo e ad una scarsa prognosi, solitamente con una mediana di sopravvivenza al di sotto di 1 anno. In aggiunta all'impatto prognostico di queste mutazioni, dati retrospettivi hanno suggerito anche un ruolo predittivo nella resistenza alla terapia con anticorpi monoclonali (MoAbs) del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), nello specifico cetuximab (C) e panitumumab (P). Tale ruolo predittivo dovrebbe essere confermato in un trial clinico randomizzato che includa anche un gruppo di controllo non in terapia con gli anticorpi anti-EGFR. Recentemente, in seguito ad analisi retrospettiva di numerosi studi di

fase III, è stata validata l'utilità dello screening delle mutazioni di RAS come fattore predittivo negativo per la terapia anti-EGFR. Al contrario, non è stato ancora validato lo screening delle mutazioni di BRAF come fattore predittivo di risposta alla terapia anti-EGFR. Tale assenza di evidenze è dovuta principalmente alla bassa prevalenza di queste mutazioni, e di conseguenza alla bassa potenza statistica, negli studi finora condotti.

Per questo motivo è stata recentemente pubblicata da *Pietrantonio F. e colleghi* su *European Journal of Cancer* una revisione sistematica con meta-analisi dei trial randomizzati al fine di valutare se l'aggiunta di C o P sia in grado di aumentare il beneficio della terapia standard o della miglior terapia di supporto (*best supportive care* - BSC) nei pazienti con CRC RAS-wt/BRAF-mut.

I *trial* sono stati identificati effettuando, sui principali motori di ricerca, l'analisi dei seguenti termini: "cancro del colon retto", "BRAF" e "cetuximab o panitumumab". Sono stati poi selezionati tutti i trial randomizzati con pazienti KRAS-wt di (1) chemioterapia + C o P vs chemioterapia +/- altri agenti target (bevacizumab), (2) chemioterapia + bevacizumab + C o P vs chemioterapia + bevacizumab e (3) C o P in monoterapia vs BSC. Tutti i trial che avevano arruolato pazienti con precedente trattamento con MoAbs anti-EGFR sono stati esclusi. I pazienti sono stati classificati come 'positivi alle mutazioni di BRAF' se era presente una mutazione identificata tramite saggi molecolari come PCR o pirosequenziamento. La maggior parte dei pazienti era *wild-type* per KRAS.

È stato estrapolato dai vari studi l'hazard ratio (HR) con relativo intervallo di confidenza al 95% (CIs) per gli *end-point* primari PFS e OS, al fine di valutare l'efficacia del trattamento all'interno del sottogruppo dei pazienti BRAF-mut. Inoltre sono stati confrontati i tassi di risposta (*overall response rate*: ORR) e gli *end-point* secondari tra i bracci di controllo e trattamento. Il rischio relativo di risposta è stato espresso come risk ratio (RR). Le stime di efficacia del trattamento sono state pesate e raggruppate utilizzando, rispettivamente, il modello della varianza inversa e il modello effetti casuali. L'eterogeneità tra gli studi e tra i sottogruppi in analisi è stata valutata con il Cochran Q test.

La strategia di ricerca ha portato all'identificazione di 3807 studi di cui soltanto 9 erano eleggibili per l'inclusione in questa meta-analisi. Le cause di esclusione degli studi erano: presenza di duplicati provenienti dai diversi motori di ricerca, presenza di lettere o revisioni ed infine assenza di analisi mutazionale di BRAF. Il numero finale di trial randomizzati inclusi nella meta-analisi era di 10, dato che uno dei lavori prendeva in analisi 2 trial randomizzati contemporaneamente. Degli studi analizzati, 6 provenivano da trial di prima-linea, due da trial di seconda-linea e due da trial di comparazione randomizzata di C e P contro BSC in pazienti refrattari e già trattati.

È stato analizzato un totale di 463 pazienti BRAF-mutati. Lo stato mutazionale di BRAF era noto per almeno l'81% dei pazienti presi in analisi.

L'analisi ha messo in evidenza come l'aggiunta dei MoAbs C e P nei pazienti BRAF-mut non era in grado di migliorare l'OS se comparata con chemioterapia o BSC (HR, 0.91; 95% CI, 0.62 – 1.34; $p=0.63$). Anche nei soli trial di prima linea l'effetto non era significativo a favore dei farmaci anti-EGFR (HR, 0.76; 95% CI, 0.54 – 1.08; $p=0.13$). Anche per la PFS i risultati non erano significativi e non era evidente un miglioramento, sia nel confronto generale (HR, 0.88; 95% CI, 0.67 – 1.14; $p=0.33$) che nei soli trial di prima linea (HR, 0.86; 95% CI, 0.63 – 1.17; $p=0.34$). Inoltre, non c'era un incremento significativo dell'ORR nel gruppo di pazienti trattato con C o P (RR, 1.31; 95% CI, 0.83 – 2.08, $p = 0.25$). Tale mancanza di effetto era simile anche nei trials di prima linea ($p = 0.31$).

Le mutazioni che ricadono negli oncogeni BRAF e RAS sono definite "driver" e sembrano essere tra gli eventi principali nella carcinogenesi del cancro del colon retto. Tuttavia, svolgono un ruolo differente nella trasformazione della cellula tumorale, nell'espressione globale dei geni e nella regolazione dell'angiogenesi. Mutazioni concomitanti di KRAS e BRAF sono molto rare (0.001%) tanto da essere considerate mutualmente esclusive. Recenti meta-analisi hanno dimostrato come in pazienti KRAS-wt, il gruppo BRAF-wt aveva un rischio minore di progressione e morte, con un aumento della risposta alla terapia se comparati con il gruppo BRAF-mut. Il ruolo predittivo delle mutazioni di BRAF non è ancora chiaro nel trattamento con anti-EGFR nei pazienti con CRC in stato avanzato. Lo studio condotto da Pietrantonio e colleghi ha dimostrato come l'aggiunta di agenti anti-EGFR alla terapia standard in pazienti RAS-wt e BRAF-mut non è associata ad un beneficio significativo in termini di OS, PFS e ORR.

Recentemente, cetuximab e panitumumab sono stati approvati per il trattamento dei pazienti con CRC avanzato RAS-wt. Ciononostante, è evidente come il ruolo di ulteriori biomarker possa essere d'aiuto nella

selezione negativa dei pazienti RAS-wt che non beneficeranno di questo tipo di trattamento. Purtroppo la bassa prevalenza delle altre mutazioni, nello specifico quelle di BRAF, renderà difficile la conferma e la validazione clinica. La scelta della strategia di prima linea è cruciale per tutti i pazienti con CRC avanzato, in quanto a causa della rapida progressione della malattia molti diventeranno inelleggibili per altre terapie di salvataggio. Questa situazione è maggiormente rilevante per il sottogruppo di pazienti con le mutazioni di BRAF, per via del fenotipo aggressivo e il decorso clinico della malattia.

I pazienti con CRC RAS-wt costituiscono circa la metà di tutti i casi e i pazienti con BRAF-mut rappresentano circa il 15-20% dei CRC RAS-wt. Di conseguenza, circa 1 su 5 pazienti RAS-wt potrebbe essere trattato in prima linea con chemioterapia + anti-EGFR senza però una chiara dimostrazione di efficacia e beneficio, giustificando invece un approccio terapeutico più aggressivo.

Questa meta-analisi presenta tuttavia delle limitazioni: il numero di pazienti BRAF-mut è limitato a causa della prevalenza di questa mutazione, e di conseguenza il numero basso di pazienti può aver inficiato la potenza statistica dello studio; inoltre, l'unica mutazione di cui erano disponibili i dati era la V600E. Altre mutazioni potrebbero essere individuate eseguendo un'analisi più esaustiva ma sarebbero comunque rare. Quindi circa il 15-20% dei pazienti in questo studio non ha un quadro completo dello stato mutazionale di BRAF. D'altro canto, questo lavoro ha numerosi punti di forza. È la prima meta-analisi a suggerire un effetto negativo della terapia anti-EGFR in questo gruppo di pazienti. Secondo, l'analisi dello stato di BRAF era disponibile per la maggior parte della popolazione nei trial analizzati. Terzo, include quasi tutti i trial condotti con C o P in prima linea di terapia. Infine, conferma che questo sottogruppo molecolare di pazienti CRC dovrebbe ricevere preferibilmente strategie mirate, inclusi gli inibitori di BRAF.

In conclusione, i test per l'analisi mutazionale di BRAF e RAS dovrebbero essere alla base del percorso diagnostico per tutti i pazienti con CRC avanzato, in modo da ottenere uno scenario prognostico e predittivo completo e utile nel processo di decisione terapeutica.

L'aggiunta di agenti anti-EGFR (cetuximab e panitumumab) alla terapia standard in pazienti con CRC avanzato RAS-wt/BRAF-mut non è associata ad un beneficio significativo in termini di OS, PFS e ORR.

Parole chiave: cetuximab, panitumumab, cancro del colon retto avanzato, KRAS, BRAF

Riferimento bibliografico

[Pietrantonio F](#) et al. *Eur J Cancer* 2015, 51(5):587-94.



Sostieni la Società Italiana di Farmacologia

La Società Italiana di Farmacologia è tra i beneficiari dei proventi del 5 per mille dell'IRPEF.

È sufficiente apporre la propria firma ed indicare, sulla dichiarazione dei redditi, nel riquadro associazioni di volontariato, onlus, associazioni di promozione sociale e da altre fondazioni e associazioni riconosciute, il Codice Fiscale della SIF che è 97053420150, per destinare tali fondi a Borse di studio SIF per giovani ricercatori.

Per maggiori informazioni, contattare la segreteria SIF: tel. 02-29520311.

sif.informazione@segr.it; sif.farmacologia@segr.it.

SIF – FARMACOGENETICA

Newsletter del Gruppo di lavoro sulla Farmacogenetica della Società Italiana di Farmacologia

Registrazione del Tribunale di Milano n° 180 data 31/03/2010 - ISSN 2282-4758

http://www.sifweb.org/gruppilavoro/sif_gruppo_farmacogen.php

Direttore	Prof. Emilio Clementi (Università di Milano)
Vice-Direttore	Prof. Diego Fornasari (Università di Milano)
Coordinatore	Dott.ssa Valentina Boscaro (Università di Torino)
Caporedattori	Dott. Gabriele Stocco (Università di Trieste) Dott. Salvatore Terrazzino (Università del Piemonte Orientale)
Web Editor	Dott. Federico Casale (Università di Torino)
Hanno contribuito a questo numero:	Dott.ssa Sarah Cargini (Università del Piemonte Orientale) Dott.ssa Donatella Carretta (Università di Bologna) Dott.ssa Stefania Cheli (AO Polo Universitario "L. Sacco" di Milano) Dott.ssa Valentina Citi (Università di Pisa) Dott.ssa Valeria Conti (Università di Salerno) Dott.ssa Marzia Del Re (Università di Pisa) Dott.ssa Alessia Di Silvestre (Università di Trieste) Dott.ssa Lucia Gozzo (Università di Catania) Dott.ssa Marianna Lucafò (Università di Trieste) Dott.ssa Gloria Ravegnini (Università di Bologna) Dott.ssa Giulia Sammarini (Università di Bologna) Dott. Vittorio Simeon (IRCCS – CROB) Dott. Alessio Squassina (Università di Cagliari)

Archivio SIF-Farmacogenetica Edicola Virtuale SIF
<http://edicola.sifweb.org/edicola/farmacogenetica/pagina/archivio>
Contatti: webmaster@sifweb.org

DISCLAMER – Leggere attentamente

SIF, Società Italiana di Farmacologia, si propone di pubblicare sul proprio sito internet www.sifweb.org informazioni precise ed aggiornate, ma non si assume alcuna responsabilità né garantisce la completezza ed esaustività delle informazioni messe a disposizione. In particolare, SIF precisa che le risposte fornite ai quesiti medico / tossicologici sono fornite sulla base della raccolta di fonti bibliografiche esistenti (rispetto alle quali non si garantisce la esaustività). Pertanto, dalle risposte ai quesiti non devono essere tratte conclusioni se non un mero richiamo alle fonti presenti in letteratura. La SIF, inoltre, avvisa gli utenti che le informazioni contenute nel proprio sito e le risposte ai quesiti hanno finalità meramente divulgative, informative ed educative e non possono in alcun modo sostituire la necessità di consultare il Ministero della Salute, l'Istituto Superiore di Sanità e più in generale le Istituzioni nazionali ed internazionali attive in materia. **IL SITO INTERNET DI SIF E LE RISPOSTE AI QUESITI NON DEVONO IN ALCUN MODO ESSERE CONSIDERATI PARERI MEDICI.** SIF, quindi, declina ogni responsabilità circa l'utilizzo del proprio sito, delle informazioni in esso contenute e delle risposte ai quesiti ed avverte l'utente che ogni e qualsiasi contenuto ed informazione del sito (comprese le risposte ai quesiti) sarà utilizzata sotto diretta e totale responsabilità dell'utente stesso. Né SIF, né alcuna altra parte implicata nella creazione, realizzazione e pubblicazione del sito internet di SIF e nelle redazioni delle risposte ai quesiti possono essere ritenute responsabili in alcun modo, né per alcun danno diretto, incidentale, conseguente o indiretto che deriva dall'accesso, uso o mancato uso di questo sito o di ogni altro ad esso collegato, o di qualunque errore od omissione nel loro contenuto. Le informazioni fornite nelle newsletters, le eventuali nozioni su procedure mediche, posologie, descrizioni di farmaci o prodotti d'uso sono da intendersi come di natura generale ed a scopo puramente divulgativo ed illustrativo. Non possono, pertanto, sostituire in nessun modo il consiglio del medico o di altri operatori sanitari. Nulla su <http://www.sifweb.org>, sulle relative newsletters, e-mails, o qualsiasi dei progetti della SIF, può essere interpretato come un tentativo di offrire o rendere un'opinione medica o in altro modo coinvolta nella pratica della Medicina. La Società Italiana di Farmacologia, i suoi Soci od altre parti ed essa connesse non possono, quindi, essere ritenuti responsabili circa risultati o conseguenze di qualunque utilizzo o tentato utilizzo di una qualsiasi delle informazioni riportate. Non sono ammesse la divulgazione e la diffusione di "SIF-Farmacogenetica" senza precedente autorizzazione scritta della Società Italiana di Farmacologia.

RICEZIONE NEWSLETTER

Nella consapevolezza che le e-mail indesiderate sono oggetto di disturbo, vi informiamo che il vostro indirizzo viene conservato e trattato nel rispetto del DL 196/03 ed in qualsiasi momento potrà esserne richiesta la modifica o cancellazione come previsto dall'articolo 13. Tutti i destinatari della e-mail sono in copia nascosta (Privacy L. 75/96).

Qualora non intendeste ricevere ulteriori comunicazioni vi preghiamo di inviare una risposta all'indirizzo sif.farmacologia@sigr.it con oggetto: CANCELLA.